ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

A microbiota e as enteropatias inflamatórias crónicas: diferentes abordagens terapêuticas em cães e gatos

Justine Etchegaray

Coimbra, julho 2022

ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

A microbiota e as enteropatias inflamatórias crónicas: diferentes abordagens terapêuticas em cães e gatos

Coimbra, julho 2022

Justine ETCHEGARAY

Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Professora Doutora Sofia Ferreira Anastácio

Arguente: Professora Doutora Maria Eduarda Moreno da Silveira

Orientador Interno

Ana Catarina Figueira

Coorientador Interno

Inês Dias

Orientadores Externos

Bertrand Pucheu (CHV Nordvet)

Guillaume Ragetly/Marine Kerjean (CHV Fregis)

Guillaume Holzapfel/Elodie Visée (La clinique du front de mer)

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos
Conducente ao grau de mestre em Medicina Veterinária da EUVG.

Ao Thomas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Professora Ana Catarina Figueira e a Professora Inês Dias, pela disponibilidade em me orientar na execução deste tese. Gostaria também de agradecer a todos os médicos veterinários e auxiliares dos diferentes locais de estágio por todo o apoio e transmissão de conhecimento, assim como à sua total disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas.

Às minhas amigas de sempre, *les pépettes*, as palavras nunca serão suficientes, para agradecer por estar aqui todos estes anos.

Aos meus pais e irmão, por me apoiaram em tempos difíceis. Às minhas avós, que acreditaram no meu sonho desde o primeiro dia e que sempre me apoiaram nesta direção

Aos meus amigos do primeiro dia da escola que me apoiaram e me ajudaram profundamente, mesmo nos momentos mais difíceis, sem a sua ajuda tudo isto não teria sido possível. Um grande obrigada: Margaux, Andy, Thomas, Anaelle, Aliénor, Julia, Mathilde, Kylie, os Louis, Auriane, Célia, Emma, Karen, Léa, Lucile, Solène, Thibaud, Valentin.

À minha madrinha da faculdade, Letícia Dias, que me adoptou e me acompanhou durante estes seis anos, recordaremos sempre do “calecon azul”.

À minha colega de casa, Margaux Bolzer, durante este seis anos, já sabe tudo.

Ao Hugo pelo teu imenso apoio nesta reta final.

Ao Thomas, meu amigo desde o primeiro dia deste curso, sem o qual eu não estaria aqui hoje. Meu amigo, o mais fiel e o mais corajoso. Lutaste como um leão e deixaste-nos como herói.

E finalmente à Escola Universitária Vasco da Gama que me permitiu entrar nesta escola e realizar um sonho.

INDICE GERAL

Índice de tabelas ..... **VII**

Lista de abreviaturas ..... **VIII**

Resumo **2**

Abstract **3**

Introdução **1**

I - Enteropatias inflamatórias crónicas **2**

II - Microbiota intestinal **6**

a) O papel da microbiota 6

b) A microbiota no crescimento 7

c) Sequenciação 8

d) Composição 9

III - Disbiose **10**

IV - Terapias que visam corrigir a disbiose **12**

a) Antibióticos 12

b) Prebióticos, probióticos, simbióticos 13

c)Transplante de Microbiota Fecal 14

Conclusão **16**

Referências bibliográficas **18**

Índice de tabelas

Tabela 1: Índice para avaliação da gravidade da DII em cães. Adaptado de Ettinger, 2016. 4

Tabela 2: Percentagem dos organismos mais encontrados de acordo com a localização a nível intestinal no cão. Adaptado de Suchodolski *et al*., 2008. 10

Tabela 3: Comparação das mudanças microbianas em cães e gatos com DII. Adaptado de Honneffer *et al*., 2014. 12

Lista de abreviaturas

CIDBAI - Canine Inflammatory Bowel Disease
DII - Doença inflamatória intestinal (DII)
DNA - Deoxyribonucleic acid
EEB - Encefalopatia Espongiforme Bovina
FELV - Feline Leukemia Virus
FIV- Feline Immunideficiency Virus
FOS - Fructo-oligossacáridos
MOS - manano-oligossacáridos
PCR - Polymerase Chain Polymerase
RNA - Ribonucleic acid
TH17 - Celulas T Helper 17
Treg - Células T reguladores

A microbiota e as enteropatias inflamatórias crónicas: diferentes abordagens terapêuticas em caẽs e gatos

Justine Etchegaray [a] , Inês Dias [b, c] Ana Catarina Figueira [a, d, e]

[a] Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 33020-210, Coimbra, Portugal. (justinetchegaray@gmail.com;ana.figueira@euvg.pt)

[b] Departamento de Ciências Veterinárias, ECAV, UTAD, Quinta de Prados, 5000-801, Vila Real, Portugal (ines.e.dias@gmail.com)

[c] CITAB - Center for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences, UTAD, Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal

[d] Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal

[e] Hospital Veterinário Universário de Coimbra, Av. José R. Sousa Fernandes 197, 3020-210, Coimbra, Portugal

Resumo

As enteropatias inflamatórias crónicas são um grupo de doenças que afetam de maneira crónica o trato digestivo. A etiologia da doença inflamatória intestinal é ainda desconhecida estando várias hipóteses a ser desenvolvidas, uma das quais envolve a microbiota intestinal. A microbiota forma um equilíbrio dinâmico e mantém uma relação simbiótica com o intestino. No passado, a única técnica disponível para obter informação sobre a microbiota era a técnica de cultura. Hoje várias técnicas estão a ser usadas, nomeadamente técnicas baseadas em rRNA de 16S. Foram descobertos cinco filos principais no cão: Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes e Proteobacteria, podendo a sua composição ser alterada por fatores como idade, dieta, raça e uso de antibióticos e levar ao desenvolvimento de uma disbiose. Foi demonstrado que na enteropatia inflamatória crónica há uma alteração da composição da microbiota e uma menor diversidade da mesma, com uma quantidade anormal de proteobacteria phylum, especialmente na família Enterobacteriaceae, bem como um aumento da população de Actinobacteria phylum. Uma diminuição do phylum Firmicutes, especificamente na ordem Clostridiales também foi destacada em cães com enteropatias inflamatórias crónicas. Contudo, muitas questões fundamentais permanecem sem resposta, as investigações sobre a microbiota intestinal são recentes, sendo um campo promissor e com grande potencial para utilização na prática clínica.

Estratégias de tratamento baseadas na restauração da flora intestinal estão a ser cada vez mais apresentadas e embora ainda não estejam suficientemente desenvolvidas, oferecem perspectivas de investigação interessantes para o futuro. A sua utilização nas enteropatias inflamatórias crónicas pode ajudar a restaurar a flora intestinal, reduzindo a disbiose intestinal. No entanto, os resultados obtidos nos estudos são muitos variáveis, nomeadamente quanto à sua eficácia real e aos seus efeitos nocivos. O transplante de microbiota fecal é também um método que visa restaurar a microbiota fecal e que tem atraído cada vez mais interesse. Contudo, ainda não existe um consenso científico sobre a sua utilização, sendo necessários mais estudos para determinar os seus efeitos a longo prazo, incluindo a sua eficácia e a segurança. Apesar dos progressos feitos na última década, este campo está cheio de oportunidades e desafios a serem explorados. Um maior conhecimento da microbiota permitirá no futuro uma melhor compreensão das doenças intestinais.

Palavra chave: enteropatias crônicos inflamatórias, microbiota, prebióticos, probioticos, simbióticos, transplante de microbiota fecal.

Abstract

Chronic inflammatory enteropathies are a group of diseases that chronically affect the digestive tract. The aetiology of inflammatory bowel disease is still unknown and several hypotheses are being developed, one of which involves the gut microbiota. The microbiota forms a dynamic balance and maintains a symbiotic relationship with the intestine. In the past, the only technique available to obtain information about the microbiota was the culture technique. Today several techniques are being used, notably techniques based on 16S rRNA. Five main phyla have been discovered in the dog: Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes and Proteobacteria, and their composition can be altered by factors such as age, diet, breed and antibiotic use and lead to the development of a dysbiosis. It has been shown that in chronic inflammatory enteropathy there is an alteration in the composition of the microbiota and a lower diversity of the microbiota, with an abnormal amount of proteobacteria phylum, especially in the Enterobacteriaceae family, as well as an increase in the Actinobacteria phylum population. A decrease in the Firmicutes phylum, specifically in the order Clostridiales was also highlighted in dogs with chronic inflammatory enteropathies. However, many fundamental questions remain unanswered, investigations into the gut microbiota are recent, and it is a promising field with great potential for use in clinical practice.

Treatment strategies based on the restoration of the gut flora are increasingly being presented and although not yet sufficiently developed, offer interesting research prospects for the future. Their use in chronic inflammatory enteropathies may help to restore the intestinal flora, reducing intestinal dysbiosis. However, the results obtained in studies are very variable, particularly with regard to their real effectiveness and their harmful effects. Faecal microbiota transplantation is also a method that aims to restore the faecal microbiota and is attracting increasing interest. However, there is still no scientific consensus on its use and further studies are needed to determine its long-term effects, including its efficacy and safety. Despite the progress made in the last decade, this field is full of opportunities and challenges to be explored. A greater knowledge of the microbiota will allow for a better understanding of intestinal diseases in the future.

Key-word: chronic inflammatory enteropathies, microbiota, prebiotics, probiotics, symbiotics, faecal microbiota transplantation.

Introdução

As enteropatias inflamatórias crónicas são um grupo de doenças que afetam de forma crónica o trato digestivo, definidas como afeções com sinais gastrointestinais persistentes ou recorrentes (Ettinger, 2016) com duração de mais de 3 semanas (Sacoor *et al.*, 2021; AlShawaqfeh *et al.,* 2017; Jergens *et al.*, 2010). A sua etiologia não é totalmente compreendida (Pilla *et al.*, 2019; Ettinger, 2002), mas parece estar relacionada com uma interação complexa entre vários fatores, nomeadamente antigénios alimentares e microbiota intestinal, que provocam uma reação imunitária anomala no animal (Redfern *et al.*, 2017; Blake *et al.*, 2016; Reiwald *et al.*, 2013). Estudos recentes tendem a centrar-se essencialmente no papel da microbiota intestinal, que foi durante muito tempo subestimada (Deng & Swanson, 2015), revelando o seu papel essencial a nível do trato digestivo e a sua relação simbiótica com o hospedeiro (Normand *et al.,* 2013). A microbiota intestinal é composta por milhões de bactérias, arqueas, vírus e organismos eucarióticos (Barko *et al.*, 2018), já o microbioma refere-se ao genoma dos organismos que constituem a microbiota (Berg *et al.,* 2020). A microbiota intervém no bom funcionamento do epitélio da mucosa intestinal, participa na produção de muco e renovação de enterócitos, na digestão dos alimentos, na extração de nutrientes, na produção de ácidos gordos, bem como na síntese de várias vitaminas, tais como as vitaminas B9, B12 e K. Desempenha também um papel central na imunidade, ao sintetizar peptídeos antimicrobianos com propriedades bactericidas e imunomoduladoras que têm um papel central na regulação da inflamação ao nível da mucosa intestinal (Redfern *et al.*, 2017). Uma alteração na composição da microbiota intestinal pode originar uma disbiose e estar na origem de doenças intestinais, bem como ser uma consequência das mesmas (Suchodolski, 2016).

As manifestações clínicas das enteropatias inflamatórias crónicas são não específicas e os animais normalmente apresentam-se para consulta com sinais de diarreia, perda de peso e/ou vómitos (Simpson & Jergens, 2011). O diagnóstico e tratamento destas patologias permanece um desafio clínico e requer uma investigação completa a fim de excluir outras causas. O exame de diagnóstico de eleição é a biópsia intestinal, por endoscopia ou por laparotomia exploratória. As amostras intestinais devem ser recolhidas de diferentes partes do intestino e avaliadas por histopatologia para definir a natureza do infiltrado inflamatório na *lâmina própria* (Sacoor *et al.,* 2021; Faucher *et al.,* 2016; Simpson & Jergens, 2011).

O presente trabalho pretende destacar o papel fundamental da microbiota intestinal e mostrar como uma modificação na sua composição - disbiose - poderá estar na origem de certas patologias intestinais. Pretende-se assim abordar as terapias que permitem restabelecer a microbiota, em particular os antibióticos, probióticos, prebióticos, bem como a técnica de transplante de microbiota fecal.

I - Enteropatias inflamatórias crónicas

As enteropatias inflamatórias crónicas afetam os carnívoros domésticos e referem-se a um grupo bastante heterogéneo de doenças intestinais crónicas caraterizadas clinicamente por sinais digestivos recorrentes e persistentes (Ettinger, 2016) e, histologicamente, por infiltração de células inflamatórias da mucosa gastrointestinal (Sacoor *et al.,* 2021; Jergens, 2012).

As manifestações desta patologia não são específicas e caracterizam-se mais frequentemente por alterações digestivas como diarreia com hematoquezia ou melena, anorexia, perda de peso, vómitos, mas também com alteração do estado geral do animal, como letargia (Eissa *et al*., 2019; Blake *et al*., 2016; Jergens *et al*., 2012 Simpson *et al*., 2011). Nos cães, as raças mais predispostas são Rottweiler, Border Collie, Boxer e Weimaraner (Kathrani *et al*., 2011), enquanto que em gatos afeta principalmente gatos adultos a idosos (Faucher *et al*., 2016) e de raça siamesa ou asiática (Jergens, 2012).

As enteropatias inflamatórias crónicas podem ser classificadas de acordo com a resposta clínica ao tratamento, de acordo com a principal região intestinal afetada e o tipo histológico de infiltrado inflamatório (Sacoor *et al.*, 2021; Moser *et al.,* 2018). Quanto à classificação de acordo com o tratamento, existem enteropatias responsivas a dieta, responsivas a antimicrobianos ou responsivas a terapia imunossupressora (Jergens *et al.* 2012; Jergens, 1993). O termo doença inflamatória intestinal (DII) é aplicado aos casos não responsivos a ensaios alimentares, nem a tratamento com antimicrobianos, necessitando por isso de terapia imunossupressora/ imunomoduladora. A etiologia da DII em Medicina Veterinária não é totalmente compreendida, sendo muitas vezes designada de idiopática (Malewska *et al*., 2011). No entanto, acredita-se que possa ser secundária a uma interação complexa entre fatores ambientais, genéticos (mutações, predisposição racial, entre outros) e a uma falha do sistema imunitário ao nível da mucosa, em que o sistema imunitário não é capaz de distinguir bactérias patogénicas de bactérias comensais, levando a um desequilíbrio na microbiota (Redfern *et al.*, 2017; Blake *et al.*, 2016; Reiwald *et al.*, 2013). Quanto à classificação de acordo com o principal local afetado podem ser enteropatias de intestino delgado ou intestino grosso, e podem ainda classificar-se de acordo com o tipo de infiltrado inflamatório presente na *lâmina própria* intestinal a nível histológico (linfócitos, plasmócitos, eosinófilos ou misto) (Sacoor *et al.*, 2021; Moser *et al.,* 2018).

Esta patologia tem sido reconhecida, até à data, como a principal causa de sinais gastrointestinais crónicos em cães (Sacoor *et al.,* 2021). Atualmente o seu sobrediagnóstico na prática clínica deve-se provavelmente às dificuldades inerentes ao seu diagnóstico (Sacoor *et al.,* 2021; Somu *et al.,* 2017).

Os exames complementares de diagnóstico permitem determinar o estádio e assim adaptar o tratamento e definir o prognóstico (Moser *et al.,* 2018). Numa abordagem diagnóstica inicial recomenda-se a realização de uma análise sanguínea completa, a fim de descartar quaisquer alterações metabólicas, no entanto, as alterações hematológicas num animal com DII são muitas vezes inespecíficas. Por vezes, pode ser identificada uma anemia ligeira em animais com inflamação crónica do trato digestivo e, em situações mais graves, hipoalbuminemia (Ettinger, 2016), sendo este

frequentemente um critério de severidade e de cronicidade da doença (Allenspach *et al.*, 2007). Em alguns cães e gatos é possível encontrar um aumento das enzimas heptáticas), sendo que nos cães este aumento é na maioria das vezes consequência de uma hepatopatia reativa secundária à inflamação intestinal (Ettinger 2016; Jergens 2012).

O exame de toque retal possibilita avaliar o aspeto das fezes, presença de muco e/ou sangue, sendo uma análise de fezes completa igualmente importante para descartar outras patologias. A análise de fezes permite excluir parasitoses digestivas (toxocariose, tricuríose, coccidiose, giardiose, tricomonose), mas também para excluir causas bacterianas (*Campylobacter spp*., *Clostridium spp.*, *Salmonella spp*.) Além disso, nos gatos é recomendado realizar um teste de despiste do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e do vírus da leucemia felina (FeLV) (Ettinger, 2016; Jergens & Simpson, 2012).

A ultrassonografia é o exame mais frequentemente realizado numa primeira abordagem quando existe envolvimento do trato digestivo. Tem um valor superior à radiografia em termos de diagnóstico de uma DII, pois pode determinar se a inflamação é focal ou difusa, se há uma perda de estratificação da parede intestinal, um espessamento da mucosa e também uma linfadenopatia mesentérica. Permite ainda detetar outras lesões associadas à DII (ascite, pancreatite, peritonite, perfuração digestiva, sinais de colestase ou colangite) e determinar o método de biopsia mais adequado (endoscopia para lesões difusas *versus* cirurgia para lesões focais) (Jergens, 2012). Contudo, a ecografia tem também as suas limitações, uma vez que não permite diferenciar com precisão a DII de outras patologias, como linfoma. Em gatos com DII é também relatado um espessamento significativo da camada muscular com uma imagem hipoecogénica, alteração esta também observada no linfoma difuso de pequenas células. Simpson & Jergens (2011) referem que gatos velhos com imagens ultrassonográficas de espessamento da camada muscular, têm maior probabilidade de diagnóstico de linfoma do que com DII. O índice clínico *Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index* (CIDBAI), representado na tabela 1, foi criado para quantificar clinicamente a gravidade da DII e é utilizado no diagnóstico da doença (Ettinger 2016).

Tabela 1: Índice para avaliação da gravidade da DII em cães. Adaptado de Ettinger, 2016.

CRITÉRIO		PONTUAÇÃO
Atitude/ Atividade	Normal	0
	Ligeiramente diminuído	1
	Moderamente diminuído	2
	Severamente diminuído	3
Apetite	Normal	0
	Ligeiramente diminuído	1
	Moderamente diminuído	2
	Severamente diminuído	3
Vómitos	Sem vómitos	0
	Ligeiro (um/semana)	1
	Moderado (2-3/semana)	2
	Severo (>3/semana)	3
Consistência das fezes	Normal	0
	Ligeiramente mole, fezes com sangue, muco ou os dois	1
	Muito mole	2
	Líquida	3
Frequência das defecações	Normal	0
	2-3/dia	1
	4-5/dia	2
	>5 por dia	3
Perda de peso	Normal	0
	Ligeira (<5%)	1
	Moderada (5 a10%)	2
	Severa (>10%)	3
Pontuação final	Sem significado clínico	0-3
	Ligeiro	4-5
	Moderado	6-8
	Severo	> 9

A pontuação final é o resultado da adição de cada score atribuído aos diferentes critérios.

O diagnóstico definitivo é realizado por meio de biópsias intestinais, que podem ser feitas por endoscopia ou por laparotomia exploratória. As biópsias intestinais de diferentes partes do intestino devem ser seguidas de um exame histopatológico para determinar a natureza do infiltrado inflamatório na l*âmina própria* (Jergens, 2012). Dependendo da sua natureza, o infiltrado inflamatório pode ser neutrofílico, eosinofílico e linfo-plasmocítico, sendo este último descrito como a forma mais frequente. A caracterização do infiltrado inflamatório permite um tratamento adaptado a cada animal. Numerosos estudos demonstraram que existe uma clara falta de correlação entre os resultados de endoscopia e histopatologia. Alguns estudos salientam também que a gravidade dos sinais clínicos não tem correlação comprovada com a gravidade das lesões histopatológicas e, portanto, não refletem a

inflamação intestinal e não têm valor prognóstico (Jergens, 2012; Malewska *et al.*, 2011). A endoscopia é menos invasiva, mas requer uma boa preparação prévia do animal, que deve estar em jejum e o cólon deve ser preparado para se poder avaliar corretamente o aspeto da mucosa. O exame histopatológico apresenta também as suas limitações e a sua correta interpretação depende em grande parte da quantidade, mas também da qualidade das amostras (Sacoor *et al.*, 2021).

Há, portanto, uma necessidade real de encontrar um método simples, minimamente invasivo e objetivo para avaliar a inflamação intestinal (Sacoor *et al.*, 2021). Novos métodos emergentes estão a ser investigados, tais como biomarcadores nomeadamente a cobalamina, os folatos e a calprotectina fecal (Collins, 2013) que são utilizados como uma medida quantificável e têm um grande potencial na determinação do diagnóstico e no tratamento e acompanhamento de cães com enteropatias inflamatórias crónicas (Sacoor *et al.*, 2021).

O folato (vitamina B9) e a cobalamina (vitamina B12) são vitaminas hidrossolúveis, presentes na maioria dos alimentos, sendo por isso rara a sua carência por causas alimentares (Heilmann & Steiner, 2018; Malewska *et al.*, 2011, Berghoff & Steiner, 2011). Estes dois biomarcadores são absorvidos em diferentes partes da mucosa intestinal, sendo a cobalamina principalmente absorvida pela mucosa do íleo e o folato pelo duodeno e jejuno. Foi demonstrado que uma inflamação crónica do intestino pode lesionar a mucosa intestinal, impedindo a correta absorção do folato e da cobalamina, o que leva a uma diminuição das suas concentrações séricas (Sacoor *et al*., 2021; Berghoff & Steiner, 2011). Um estudo de Heilmann *et al*. (2018) revela que a hipocobalaminemia está presente em 30% dos cães com enteropatias inflamatórias crónicas e que está associada a um pior prognóstico (Heilmann *et al.*, 2018). Contudo, uma hipocobalaminemia e uma hipofolatemia não são patognomónicos de enteropatias (Heilmann & Steiner, 2018; Malewska *et al*., 2011). Estas alterações podem estar associadas a outras doenças como a insuficiência pancreática exócrina ou a uma proliferação bacteriana a nível intestinal que faz aumentar os níveis séricos para valores normais (Sacoor *et al*., 2021; Allenspach *et al.* 2016). Os Baixos níveis séricos de folato e cobalamina também não permitem distinguir o tipo de enteropatia inflamatória crónica, não havendo diferença significativa entre as enteropatias que respondem a antibióticos das que respondem a alteração de dieta e das idiopáticas (Sacoor *et al.,* 2021; German *et al.*, 2003). Um nível normal da concentração sérica de folato e cobalamina não exclui uma enteropatia inflamatória crónica uma vez que existem reservas corporais capazes de compensar as perdas (Sacoor *et al.*, 2021; Heilmann & Steiner, 2018). Independentemente da patologia subjacente, os níveis de folato e cobalamina devem ser corrigidos porque a sua diminuição pode levar a graves alterações metabólicas (Sacoor *et al.*, 2021; Berghoff & Steiner, 2011).

O tratamento varia em função da gravidade dos sinais clínicos (Sacoor *et al.*, 2021), da avaliação dos critérios histológicos (por exemplo da natureza do infiltrado inflamatório na *lâmina própria*), dos custos e dos efeitos secundários. Assim, num animal sem outras alterações sistémicas, o tratamento inicial inclui o uso de anti-helmínticos e anti-protozoários de largo espectro de ação (por exemplo, combinação de pirantel e praziquantel) (Jergens, 2012). A modificação da dieta é também importante, devendo ser hipoalergénica, de alta digestibilidade, com baixo teor em gordura e baseada numa única fonte proteica. A fonte de proteína deve ser nova ou não hidrolisada, para que esta não

seja reconhecida pelo organismo (ex: proteína de pato, avestruz, cavalo) (Ettinger, 2016 ; Jergens, 2012) e os hidratos de carbono devem ser altamente digeríveis e ter um baixo teor em lactose e fibras (Jergens 2012; Guilford WG, *et al.,* 1996). A adaptação da dieta é um ponto chave no tratamento das DII, tendo Jergens *et al*. (1992) demonstrado que em gatos (n=55) diagnosticados com DII a adaptação da dieta permitiu a resolução dos sinais clínicos em 50%. O tratamento com antibióticos como o metronidazol, tilosina ou oxitetraciclina pode ser justificado para tratar qualquer sobrecrescimento bacteriano intestinal e também devido à importância dos antigénios bacterianos na patogenia da DII (Makielski *et al.,* 2019; Dias *et al.,* 2019; Ettinger, 2016, Simpson & Jergens, 2011).

No caso de não haver resposta aos tratamentos anteriores ou no caso de animais com perda de condição corporal e hipoalbuminemia é recomendada a terapia com imunossupressores/ imunomoduladores (ex. prednisolona, acetato de metilprednisolona, ciclosporina e clorambucil) (Makielski *et al.,* 2019, Jergens, 2012). O uso de células estaminais mesenquimatosas é considerado uma terapia imunomoduladora e com potencial anti-inflamatório com bons resultados, e tem sido estudada nos últimos anos como uma alternativa em casos refratários (Dias *et al.,* 2019). Nestes animais, pode ainda ser necessário terapias de suporte, como a fluidoterapia, o uso de antidiarreicos e anti-eméticos (Makielski *et al.,* 2019).

Apesar das várias opções terapêuticas, a terapia inicial não imunossupressora tem um papel muito importante pois auxilia na diminuição da inflamação e na exclusão de outras causas etiológicas. Os probioticos, prébioticos e simbióticos são exemplos de tratamentos complementares que podem ser utilizados e com bons resultados (Makielski *et al.*, 2019). Cada vez mais estudos defendem o potencial papel terapêutico dos agentes prébióticos e probióticos na doença inflamatória intestinal humana, que se podem transpor para a medicina veterinária (Jergens, 2012). O transplante de microbiota fecal é uma técnica ainda pouco aplicada na medicina veterinária, mas igualmente com um potencial terapêutico promissor (Normand *et al.,* 2013).

II - Microbiota intestinal

A etiologia das DII é ainda desconhecida estando várias hipóteses em estudo, nomeadamente uma que envolve a microbiota intestinal (Atherly *et al.,* 2019).

a) O papel da microbiota

A microbiota intestinal é composta por milhões de bactérias, arqueas, vírus e organismos eucarióticos que existem em permanência no trato gastrointestinal, formando um equilíbrio dinâmico e relações simbióticas com o hospedeiro (Barko, *et al*., 2018; Normand *et al.*, 2013; Cho & Martin, 2012).

A microbiota é essencial ao equilíbrio intestinal protegendo o hospedeiro frente à colonização por enteropatógenos (Pereira *et al*., 2018), formando uma barreira que secreta fatores antimicrobianos,

impedindo assim a sua proliferação e consequentes danos (Redfern *et al*., 2017). Participa no bom funcionamento do peristaltismo, promovendo a motilidade intestinal e impedindo a adesão de agentes patogénicos à mucosa intestinal (Redfern *et al*., 2017). Oferece um ambiente propício ao bom funcionamento da mucosa intestinal, mantendo os valores de pH e de oxigénio ideais (Redfern *et al*., 2017) e produz serotonina, importante no desenvolvimento neurológico (Pilla *et al*., 2020). Desempenha um papel fundamental na nutrição do hospedeiro, uma vez que fornece nutrientes essenciais (Pilla *et al*., 2020; Redfern *et al*., 2017) e é responsável pela degradação de certos polissacarídeos como os hidratos de carbono que por sua vez são utilizados sob a forma de fibras pela microbiota e produzem ácidos gordos de cadeia curta (como o butirato e o propionato). Estes metabolitos desempenharam um papel anti-inflamatório, uma vez que promovem a proliferação de linfócitos T imunorreguladores (Pilla *et al*., 2020; Tsai *et al*. 2019; Barko *et al*., 2018). Alguns exemplos de bactérias produtoras de ácidos gordos de cadeia curta são *Faecalibacterium prausnitzii, Eubacterium rectale, Eubacterium hallii* e *Ruminococcus bromii* (Blake & Suchodolski, 2016). As bactérias também promovem a auto-tolerância, diminuindo a resposta defensora aos outros microrganismos residentes (Redfern *et al*., 2017).

Estes microrganismos desempenham também um papel no metabolismo dos ácidos biliares, auxiliando na digestão e absorção dos ácidos gordos a nível intestinal. Os ácidos biliares primários são produzidos pelos hepatócitos a partir do colesterol e são excretados na bílis no intestino, enquanto os ácidos biliares secundários são produzidos pela microbiota intestinal a partir dos ácidos biliares primários (Breton, 2020). Desta forma, uma modificação na composição microbiana intestinal pode levar a alterações na produção dos ácidos biliares e causar perturbações metabólicas no hospedeiro. Os ácidos biliares secundários têm propriedades anti-inflamatórias e inibem a proliferação de esporos de *Clostridium difficile*, impedindo a propagação desta bactéria patogénica para o hospedeiro (Breton, 2020; Deng & Swanson, 2015). Assim, os ácidos biliares são um excelente exemplo da interação estreita entre o intestino e a microbiota e o hospedeiro (Suchodolski, 2016).

A nível imunitário, a microbiota intestinal pode desempenhar um papel anti-inflamatório ou, pelo contrário, ter um papel pró-inflamatório, dependendo do tipo de recetores de reconhecimento molecular que possuem e do padrão de reconhecimento que efetuam (Barko *et al.*, 2018). Desde o nascimento, a mucosa intestinal está sujeita a diferentes antigénios, tanto microbianos como dietéticos. A microbiota estimula a imunidade através da ativação de células B, mas também de linfócitos TH17 e Treg. Estas células têm um papel importante, uma vez que conferem uma atividade anti-inflamatória, mas também pró-inflamatória (Rachel Pilla *et al.*, 2020; Barko *et al.*, 2018; Blake *et al.*, 2016).

b) A microbiota no crescimento

No ser humano, a microbiota é adquirida a partir das primeiras horas de vida do recém-nascido e a sua composição sofre influência materna, bem como influência de estímulos externos durante as primeiras horas de vida da criança. Ao longo da vida, dependendo da idade e do ambiente, a composição da microbiota muda. Estudos concordam também que a composição da microbiota varia ao longo do trato digestivo, sendo que a riqueza e diversidade de bactérias aumenta ao longo do trato.

Desta forma, há mais bactérias e populações mais diversificadas no cólon do que no intestino delgado (Barko *et al*., 2018; Dominguez-Bello *et al*., 2010).

Foram realizados poucos estudos em gatos e cães sobre a aquisição e desenvolvimento da microbiota. No entanto, estudos recentes realizados em animais de laboratório apontam que a microbiota intestinal influencia o desenvolvimento de vários sistemas orgânicos, como o sistema imunitário, sistema nervoso e mesmo o epitélio intestinal (Barko *et al.,* 2018).

A composição da microbiota é influenciada pela idade, dieta, estímulo ambientais, uso de antibióticos e apresenta também uma grande variação inter e intra-individual em animais da mesma espécie (Deusch *et al*., 2015; Hooda *et al*., 2013). Hooda S *et al.* (2013) mostram que a composição da microbiota fecal é diferente em gatinhos de 8 semanas e gatinhos de 16 semanas após o desmame, mas que a microbiota estabiliza em gatos adultos saudáveis. Concluíram também que a composição da microbiota dos recém-nascidos está fortemente ligada ao ambiente e às influências parentais e que as mudanças subsequentes são influenciadas pela dieta alimentar. Hand *et al*. (2013) demostram que cães geneticamente relacionados têm uma composição da microbiota intestinal mais semelhante do que cães não relacionados, mas destacam a influência dos estímulos ambientais na sua composição, nomeadamente a influencia da dieta.

c) Sequenciação

Anteriormente para se estudar a microbiota recorria-se a técnicas de cultura, contudo, poucos microrganismos foram capazes de crescer e assim serem identificados e estudados em laboratório. O desenvolvimento de técnicas moleculares, como a sequenciação da microbiota surgiu desta necessidade, sendo uma técnica relativamente recente (Blake *et al.*, 2016; Deng, *et al*., 2015; Suchodolski *et al*., 2008).

A disponibilidade de técnicas de sequenciamento de DNA, combinada com o desenvolvimento da tecnologia informática, permitiu a identificação da microbiota e caraterização do microbioma. Vários métodos moleculares baseados no gene rRNA microbiano 16S emergiram. Este gene é ubiquitário, está presente em todas as bactérias e arqueias e contém regiões conservadas e de sequência variável, o que torna possível diferenciar os microrganismos. Assim, várias técnicas baseadas em rRNA de 16S emergiram, tais como a hibridação *in situ*, a técnica de PCR quantitativa e técnicas de gel, tais como análise de polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (RFLP) (Redfern *et al*., 2017; Deng *et al*., 2015).

Até à data foram poucos os estudos que avaliaram a composição microbiana de cães e gatos saudáveis (Guard *et al.*, 2015; Ritchie *et al*., 2010). No entanto, os resultados não são constantes. Estas variações podem estar relacionadas com o tipo de amostra utilizada (Swanson, *et al.*, 2011), uma vez que a microbiota varia ao longo do intestino, tornando difícil a obtenção de amostras específicas de uma única região do trato digestivo (Pilla *et al*., 2020; Atherly *et al.,* 2019; Blake *et al*., 2016), havendo além disso variação inter-individual e intra-individual (Swanson, *et al*., 2011). Embora cada vez mais

eficientes, as técnicas de sequenciação têm também limitações. A sequência genética de 16S rRNA é um dos métodos mais promissoras para caraterizar comunidades microbianas intestinais, no entanto, é ainda limitado na deteção de cargas bacterianas baixas. A técnica de PCR quantitativa permite a deteção da carga bacteriana e caracteriza grupos de bactérias de baixa abundância. A fim de melhorar os resultados dos estudos, seria útil no futuro combinar estas duas técnicas (Blake & Suchodolski, 2016).

d) Composição

Suchodolski *et al.* (2008) descreveram a diversidade da comunidade microbiana intraluminal em cães utilizando a técnica de sequência genética 16S rRNA, caracterizando as diferentes populações bacterianas presentes no duodeno, jejuno, íleo e cólon, referindo que havia quatro filos principais no cão: *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*.

Como exposto na tabela 2, *Firmicutes* é o filo bacteriano mais diversificado e abundante do trato intestinal canino, inclui *Clostridiales*, a ordem mais predominante de bactérias, presente em 40% no duodeno, 39% no jejuno, o componente principal no íleo (25%) e 26% no cólon (Suchodolski *et al.,* 2008).

Estudos de Handl *et al.*, 2011, também determinaram que *Clostridia* era a classe mais predominante de bactérias, dominados pelos géneros *Clostridium* e *Ruminococcus,* com mais de 65% das sequências pertencentes a este grupo. Os clostridios estão eles próprios divididos em grupos, sendo os grupos XI os mais presentes no intestino proximal e o grupo XIVa os predominantes no cólon (Suchodolski *et al*., 2008). *Lactobaccillus spp.* (pertencente ao *Firmicutes*) encontram-se em toda a extensão do intestino, mas predominantemente no duodeno e jejuno. Foram encontradas proteobactérias em 32% do duodeno e em apenas 1,4% do cólon. As fusobactérias foram encontradas esporadicamente no intestino proximal (duodeno e jejuno), sendo o filo mais abundante no íleo. O estudo destacou assim, as diferenças na carga bacteriana entre as diferentes partes do intestino do cão, bem como um aumento geral na diversidade e no número total de bactérias ao passar do duodeno para o íleo. No entanto, como anteriormente referido, estes resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que cargas relativas destes grupos bacterianos variaram significativamente entre estudos (Guard *et al.*, 2015; Handl *et al.*, 2011; Garcia-Mazcorro *et al.*, 2011; Ritchie *et al.*, 2010).

Estas variações podem dever-se a diferenças nos métodos de extração de DNA genómico, protocolos de amplificação de DNA e condições de armazenamento de amostras, bem como aos diferentes locais de colheita das amostras (duodeno, jejuno, íleo, cólon) (Deng & Swanson, 2015).

Tabela 2: Percentagem dos organismos mais encontrados de acordo com a localização a nível intestinal no cão. Adaptado de Suchodolski *et al.*, 2008.

Organismos	Duodeno	Jejuno	Íleo	Cólon
Filo *Firmicutes*	Filo bacteriano mais diversificado e abundante do trato intestinal canino			
Filo *Firmicutes* Ordem *Eubacteriales*	40 % Cluster XI (o mais abundante)	39% Cluster XI (o mais abundante)	25 % Cluster XI (o mais abundante)	26 % Cluster XIVa (o mais abundante)
Filo *Fusobacteria*	Esporádico	Esporádico	32,6 %	28,9% (um dos constituentes mais abundantes)
Filo *Proteobacteria*	32 %	-	-	1,4 %

III - Disbiose

A microbiota intestinal mantém uma relação simbiótica e dinâmica com o intestino. Este equilíbrio pode ser perturbado por vários fatores (Pilla *et al.,* 2020), nomeadamente stress, administração de antibióticos, dieta, ambiente, bem como patologias concomitantes, por modificação da composição da microbiota, assim como das suas funções (Tsai *et al.,* 2019; Redfern *et al.,* 2017; Blake & Suchodolski, 2016) e originar uma disbiose. A disbiose é definida como uma alteração na composição da microbiota intestinal que resulta em alterações funcionais no transcriptoma, proteoma e metaboloma microbiano (Pilla, *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2017).

A disbiose representa uma alteração profunda na composição do microbioma e pode ser caracterizada por três critérios: uma redução da diversidade bacteriana global (Suchodolski, 2016; Minamoto *et al.*, 2015; Suchodolski *et al.*, 2012), uma diminuição da estabilidade das comunidades microbianas e, portanto, uma maior taxa de flutuação, e uma redução da taxa de anaeróbios obrigatórios dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, devido a um aumento dos anaeróbios facultativos, particularmente os membros da família Enterobacteriaceae (Marsilio *et al.,* 2019).

Foi demonstrado que na enteropatia crónica a composição da microbiota intestinal encontra-se alterada (Sacoor *et al.*, 2021). Como a microbiota participa na auto-tolerância e na regulação do sistema imunitário, uma alteração da sua composição pode levar a uma resposta imunitária inadequada, podendo desencadear uma DII (Omori *et al.*, 2017).

Vários estudos têm investigado a composição da microbiota na doença. Na tabela 3 encontra-se um resumo das principais variações da microbiota que se podem encontrar na DII. Em cães com enteropatias inflamatórias crónicas foi demonstrada uma menor diversidade da microbiota (Sacoor *et al*., 2021; Eissa *et al*., 2019), mas também um aumento anormal do filo *Proteobacteria* (Sacoor *et al*., 2021; Honneffer *et al*., 2014), especialmente na família *Enterobacteriaceae* (Simpson e Jergens, 2011), bem como um aumento da população de *Actinobacteria*. Uma diminuição do filo *Firmicutes* (Honneffer *et al*., 2014), especificamente na ordem *Clostridiales* (Eissa *et al*., 2019) também foi destacada em cães com enteropatias inflamatórias crónicas (Sacoor *et al*., 2021; Eissa *et al*., 2019).

Marsilio *et al*. (2019) compararam a composição do microbiota em gatos saudáveis e gatos com enteropatias crónicas e com linfoma intestinal de células pequenas (Marsilio *et al.*, 2019). Verificaram que nos gatos com enteropatias crónicas havia uma baixa presença dos filo *Firmicutes* (nomeadamente família *Ruminococcaceae* e género *Turicibacter*), do filo *Actinobacteria* (género *Bifidobacterium*) e *Bacteroidetes* (nomeadamente *Bacteroides plebeius*), tendo também constatado um aumento das bactérias anaeróbias facultativas como as *Enterobacteriaceae (*filo *Proteobacteria)* e Streptococcaceae. O estudo revelou também que as famílias *Bifidobacteriaceae*, Ruminococcaceae, *Turicibacteraceae e Paraprevotellaceae* estão associadas à composição da microbiota saudável. Já nos gatos com enteropatias crónicas existe uma diminuição das bactérias produtoras de butirato, com efeito protetor, efeito anti-inflamatório e imunomodulador (Marsilio, *et al.*, 2019; Frank *et al.,* 2007).

Um outro estudo em cães utilizou a hibridação *in situ* para determinar a microbiota fecal predominante de cães com diarreia crónica. O estudo revelou uma maior abundância de *Bacteroides spp,* mas menos *Lactobacillus spp* e *Enterococcus spp* em comparação com cães saudáveis (Jia *et al.*, 2010). Um estudo de Honneffer *et al.*, (2014) comparou ainda a disbiose canina e a disbiose humana na doença de Crohn ou colite ulcerosa. O estudo revelou semelhanças nas alterações sofridas pela microbiota em ambas as espécies.

A disfunção gastrointestinal e a disbiose intestinal parecem estar intimamente relacionadas. Assim, é importante lembrar que as investigações sobre o microbioma intestinal são recentes, sendo um campo promissor e com grande potencial para utilização na prática clínica (Sacoor *et al.*, 2021).

Tabela 3: Comparação das mudanças microbianas em cães e gatos com DII. Adaptado de Honneffer *et al*., 2014.

Organismos	Cão	Gato
Firmicutes	DIminuição	
Classe *Clostridiales*	Diminuição	
Família *Ruminococcacea* (Cluster IV)	Diminuição	
Família *Lachnospirceae* (Clostridial cluster XIVa)	Diminuição	
Bacteroidetes género Bacteroidetes	Diminuição	Diminuição
Fusobacteria	Diminuição	
Proteobacteria	Aumento	Aumento
Família *Enterobacteriaceae*	Aumento	Aumento
Escherichia coli	Aumento	
Actinobacteria	Aumento	
Mycobacterium avium subspecie *pseudotuberculosis*	Aumento	
Género *Bifidobacterium*		Diminuição

IV - Terapias que visam corrigir a disbiose

a) *Antibióticos*

Uma das primeiras linhas de tratamento da enteropatia crónica é a antibioterapia e a modificação da dieta (Simpson *et al.*, 2011; Malewska *et al.*, 2011; Guilford, *et al.*, 2001; Jergens *et al*.,1992).

Os antibióticos mais frequentemente utilizados são o metronidazol e a tilosina. O metronidazol é utilizado tanto como antimicrobiano, antiparasitário, bem como imunomodulador (Simpson &. Jergens, 2011). De facto, algumas enteropatias crónicas podem ser de origem bacteriana, sendo classificadas como enteropatias com resposta antimicrobiana. É também importante notar que a utilização de antimicrobianos está usualmente associada à administração de glucocorticóides (por exemplo, prednisolona) sendo assim difícil determinar a eficácia individual dos antibióticos (Redfern, 2017; Jergens *et al.*, 2010).

Uma das principais consequências do uso de antibióticos é a perturbação da microbiota intestinal, levando a uma perda de biodiversidade de espécies comensais. Por exemplo, o uso de antibióticos pode ser responsável por um rápido e significativo declínio na riqueza e diversidade de bactérias da microbiota (Pilla *et al*., 2020; Wang *et al.*, 2019; Arthur *et al.*, 2016). Estudos a longo prazo

descrevem recuperação destes distúrbios até quatro anos após o término dos antibióticos, outros falam mesmo até dez anos após a sua administração. É também importante notar que as perturbações ligadas a estas administrações variam de acordo com o indivíduo e o antibiótico utilizado (Arthur *et al.*,2016). Por conseguinte, recomenda-se que a necessidade real do uso de antibióticos seja avaliada caso a caso e não como uma terapia *standard* (Redfern *et al.* 2017).

b) *Prebióticos, probióticos, simbióticos*

Os antibióticos podem ter efeitos benéficos no tratamento das enteropatias, mas também podem ter efeitos prejudiciais sobre a microbiota. Assim, tem havido um interesse crescente nos probióticos, prebióticos, simbióticos e transplante de microbiota fecal (TMF) como alternativas terapêuticas (Pilla *et al.*, 2020).

Os prebióticos são substâncias alimentares não digeríveis que promovem o desenvolvimento de bactérias benéficas (por exemplo *Bifidobacterium spp*. e *Lactobacillus spp.*) presentes na microbiota intestinal do hospedeiro. São compostos principalmente por hidratos de carbono não absorvíveis, tais como dissacáridos (lactulose, tagatose), oligo- ou polissacáridos (fructo-oligossacáridos (FOS), manano-oligossacáridos (MOS) xilooligossacarídos, polidextrose, galacto-oligossacarídos ou prebióticos de cadeia longa, como a inulina (Schmitz *et al.,* 2016; Ogué Bon *et al.,* 2010; Roberfroid *et al.,* 2010). Os probióticos fornecem uma fonte exógena de bactérias vivas ao hospedeiro, permitindo que a microbiota cresça. Os simbióticos são produtos que contêm uma combinação de probióticos e prebióticos, trabalhando sinergicamente (Tsai *et al.*,2019; Lee, *et al.* 2003).

Os probióticos, prebióticos e simbióticos ajudam a manter a homeostase e a integridade intestinal, bem como a prevenir a multiplicação de bactérias patogénicas (Tsai *et al.*, 2019; Walker *et al.,* 2008, Lee *et al.,* 2003). Estimulam a produção seletiva de ácidos gordos essenciais, vitaminas e antimicrobianos (Tsai *et al.*, 2019; Sivaprakasam *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2009), sendo os ácidos gordos de cadeia curta essenciais para o bom funcionamento do intestino, mantendo o pH luminal e o peristaltismo. Desempenham um papel importante no sistema imunitário, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a população de linfócitos Treg. (Tsai *et al.*, 2019; Sivaprakasam *et al.*, 2016; Pagnini *et al.,* 2010) e estão também envolvidos na regulação do metabolismo primário e secundário dos ácidos biliares, bem como na regulação do trânsito gastrointestinal. Desempenham além disso um papel na neutralização de substâncias cancerígenas (Tsai *et al.*, 2019; Sivaprakasam *et al.,* 2016). Desta forma, um dos objetivos dos probióticos/ prebióticos/ simbióticos é manter o equilíbrio do ecossistema intestinal e, assim, manter o número relativo de bactérias entre os filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (Tsai *et al.*, 2019; Hemarajata *et al.,* 2013), abrindo um caminho para a resolução da disbiose.

Em humanos, o uso de probióticos, prebióticos e simbióticos parece ser uma estratégia terapêutica promissora e, de um modo geral, segura em várias patologias. Alguns estudos reportam também que podem ser utilizados na prevenção de diarreia associada à toma de antibióticos, na

redução da incidência da encefalopatia espongiforme bovina em recém-nascidos prematuros, e na prevenção e tratamento da colite ulcerosa (Tsai *et al.*, 2019). Em humanos, a sua utilização pode ser recomendada também no tratamento das enteropatias crónicas, uma vez que permitem a reposição da composição da microbiota de uma forma equilibrada (Tsai *et al.*, 2019; Pandey *et al.*, 2016).

Alguns estudos relatam potenciais efeitos deletérios dos probióticos/ prebióticos/ simbióticos, especialmente em doentes com falência de múltiplos órgãos, tendo-se demonstrado que o uso de probióticos aumenta a translocação bacteriana devido à imunossupressão severa (Tsai *et al.,* 2019; Knopp *et al.*, 2006).

Em pequenos animais, tal como em humanos, os probióticos/ prebióticos/ simbióticos, permitem o crescimento seletivo de bactérias benéficas, podem ajudar a manter e promover a saúde e o bem-estar ótimos do trato digestivo dos animais de companhia. Podem assim modificar a microbiota reduzindo a disbiose, proteger os animais de bactérias patogénicas (seleção de bactérias benéficas e suporte de peristaltismo), bem como modular a resposta imunitária do intestino. No entanto, são necessários mais estudos para identificar e caracterizar os seus reais benefícios para a saúde e bem-estar geral dos cães e dos gatos. Além disso, a principal estirpe probiótica utilizada são os enterococos, que podem ser patogénicos e têm capacidade de rápido crescimento, induzir resistência aos antibióticos e promover o crescimento de microrganismos potencialmente perigosos em animais e seres humanos. Portanto, embora não tenham sido relatadas infeções enterocócicas probióticas em animais, estas podem teoricamente representar algum risco (Grześkowiak *et al.*, 2015).

Os riscos associados à utilização de prebióticos/ probióticos/ simbióticos em animais devem ser avaliados, devendo ser dada especial atenção ao desenvolvimento de ferramentas para monitorizar a atividade probiótica durante o processamento e armazenamento de probióticos caninos e felinos (Grześkowiak *et al.*, 2015).

c) Transplante de Microbiota Fecal

Devido à fraca resposta às terapêuticas disponíveis, estão a ser estudadas novas técnicas, em particular, técnicas destinadas a manipular a microbiota intestinal a fim de resolver a disbiose (Pillat *et al.*, 2020; Borody *et al.*, 2011), nomeadamente a técnica de Transplante de Microbiota Fecal (TMF). O TMF baseia-se "na infusão de uma suspensão fecal de um indivíduo saudável no trato digestivo de um indivíduo doente, a fim de resolver a disbiose intestinal" (Borody *et al.*, 2013).

Esta técnica é cada vez mais utilizada em medicina humana, mas também em medicina veterinária (Pereira *et al.*, 2018). O mecanismo de ação ainda é desconhecido, mas nos seres humanos tornou-se o tratamento mais eficaz para as infeções recorrentes por *Clostridium difficile* (Borody *et al.,* 2013; Surawicz *et al*., 2013; Brandt *et al.* 2013). O TMF é uma técnica promissora que poderá vir a ser alargada a outras condições que causam um desequilíbrio na microbiota, em particular a síndrome do intestino irritável, doenças inflamatórias crónicas do intestino (doença de Crohn, colite ulcerativa), obesidade e diabetes *mellitus* (Wang *et al.,* 2019; Borody *et al*., 2013; Borody *et al.,* 2011).

Embora tenham sido realizados poucos estudos em cães, os resultados parecem ser promissores. Berlanda *et al.* (2021) apresentou um caso de um cão com enteropatia crónica, com recidiva de sinais clínicos após tratamento com febendazol, psyllium, ranitidina e antibióticos (metronidazol e espiramicina) e sem melhoria dos sinais clínicos após o início da terapia com corticosteróides. Neste animal foram realizados dois tratamentos com TMF com 8 meses de intervalo, tendo-se demonstrado uma melhoria do estado geral e do apetite, uma normalização da consistência das fezes, uma clara melhoria nos episódios de hematoquezia e vómitos, embora ainda presentes após o primeiro transplante, bem como um aumento de peso de 20% (Berlanda *et al.*, 2021). Foram realizadas várias avaliações do microbioma, incluindo o tipo de espécies presentes, permitindo acompanhar a evolução do microbioma ao longo do tempo. Foi descrito que no início do estudo, o recetor tinha uma grande abundância de fusobactérias que fazem parte do filo *Firmicutes*. No entanto, após o primeiro e segundo transplantes, a composição do microbioma intestinal tendeu a aproximar-se do dador (saudável). O estudo também relata que *Clostridium hiranonis,* tem um papel positivo na saúde do cão e que a sua aquisição, mesmo a níveis baixos, pode ter um impacto profundo na comunidade simbiótica (Berlanda *et al.*, 2021). As alterações na composição da microbiota juntamente com a melhoria clínica do cão sugerem uma recuperação do microbioma intestinal. No entanto, foi também demonstrado que seis meses após o primeiro transplante algumas taxas regrediram. Assim, a eficácia a longo prazo deste método é questionável e, apesar de haver estudos que suportem um futuro promissor do TMF, muitas questões permanecem por responder. Uma das limitações dos estudos é a falta de padronização do método de preparação da amostra, do desempenho da técnica ou mesmo sobre a seleção do dador (Niina *et al.,* 2019; Wang *et al.,* 2019).

Nos estudos realizados, os dadores foram selecionados com base em determinados critérios, nomeadamente serem dadores saudáveis, sem fatores de risco de doenças transmissíveis ou problemas que possam alterar a microbiota saudável, tais como o uso de antibióticos (Wang *et al.,* 2019; Redfern *et al.,* 2017; Borody *et al.,* 2013). Relativamente à preparação da suspensão fecal a administrar, não há consenso e os métodos de preparação diferem entre estudos (Sugita *et al.,* 2019, Redfern *et al*., 2017). A maior variabilidade permanece no modo de administração, havendo dois tipos de administração: oral (nasogástrica, nasoentérica) ou rectal (colonoscopia, enema, etc.). Não existe atualmente consenso sobre qual é o modo de administração mais eficaz. No entanto, um estudo sobre a utilização de TMF na infeção recorrente por *Clostridum difficile* nos seres humanos sugere uma taxa de sucesso mais elevada com a administração pelo trato digestivo inferior do que com a administração do trato digestivo superior (91% *vs* 82%) (Borody *et al.*, 2013).

Assim, cada modo de administração tem as suas vantagens e desvantagens, sendo difícil chegar a um consenso sobre um modo de administração de eleição (Sugita *et al*. 2019; Redfern *et al.*, 2017). Uma das inegáveis vantagens do TMF é a sua segurança (Dailey *et al.,* 2019). De facto, no mesmo estudo realizado em cães com enteropatia crónica (Sugita *et al.*, 2019; Niina *et al*. 2019) não foram revelados efeitos secundários atribuídos ao TMF. Do mesmo modo, na literatura veterinária, os chamados efeitos secundários não foram relatados (Berlanda *et al.*, 2021; Pereira *et al*., 2018; Burton

et al., 2016). Por conseguinte, parece ser uma técnica relativamente segura, mesmo que os efeitos a longo prazo, após vários procedimentos repetidos, não tenham sido estudados (Wang *et al.,* 2019).

O TMF continua a ser uma das terapias mais promissoras porque, para além do aspeto da segurança, poderia ser alargada a outras patologias como a artrite reumatóide, halitose, depressão, diabetes, entre outras (Borody *et al.*, 2013). Uma das utilizações que pode ser relevante particularmente em medicina veterinária é o seu uso no tratamento da parvovirose canina (Pereira *et al*., 2018). Giorgio Q. *et al.* (2018) demonstrou que a utilização de TMF em combinação com terapia padrão num grupo de cães afetados pelo parvovírus resultou numa recuperação clínica mais rápida e, consequentemente, numa diminuição dos dias de hospitalização, bem como numa redução dos custos e melhoria de prognóstico.

Conclusão

A realização de estudos com abordagens moleculares para caracterizar a microbiota intestinal de cães e gatos fornece evidências claras do impacto que os distúrbios gastrointestinais têm nas comunidades microbianas do intestino delgado e grosso. A microbiota intestinal tem um papel inegável na homeostasia do organismo, nomeadamente na defesa contra agentes patogénicos intestinais, promoção da boa motilidade intestinal, extração de nutrientes essenciais, na produção de ácidos gordos de cadeia curta, no metabolismo dos ácidos biliares secundários, bem como no desenvolvimento e regulação do sistema imunitário. Embora ainda não seja totalmente compreendido o processo pelo qual a microbiota influencia os diferentes sistemas orgânicos, a sua ação é essencial para a saúde canina e felina. A melhor caracterização dos agentes presentes na microbiota permitiu avançar significativamente a compreensão atual da microbiota intestinal.

As enteropatias crónicas são bastante comuns na medicina veterinária canina e felina e baseia-se na maioria das vezes num diagnóstico de exclusão, sendo a etiologia complexa e multifatorial. A disbiose está muita das vezes na origem destas enteropatias. Contudo, muitas questões fundamentais permanecem sem resposta, nomeadamente a influência destas bactérias no organismo. Apesar de existirem bactérias patogéncias, outras podem ter um efeito imunomodulador e anti-inflamatório benéfico para o animal.

Os probióticos, prebióticos e simbióticos são fontes exógenas que juntamente com a dieta ajudam a manter a homeostase intestinal, prevenir a multiplicação de agentes patogénicos, bem como a produção seletiva de ácidos gordos essenciais. A sua utilização nas DII pode ajudar a restaurar a flora intestinal, reduzindo a disbiose intestinal. No entanto, os resultados obtidos nos estudos são muitos variáveis, nomeadamente a sua eficácia real e aos seus efeitos nocivos.

O transplante de matéria fecal é também um método que visa restaurar a microbiota fecal. Está a suscitar cada vez mais interesse na comunidade científica, tanto como tratamento de escolha para a infeção recorrente por *Clostridium difficile*, mas também como método de tratamento promissor para a enteropatia crónica e parvovirose.

Um maior conhecimento da microbiota permitirá no futuro uma melhor compreensão das doenças inflamatórias intestinais. As investigações sobre a microbiota intestinal são ainda recentes, sendo, contudo, um campo promissor e com potencial futuro na prática clínica, pelo que estratégias de tratamento baseadas no restauro da flora intestinal estão a ser cada vez mais estudadas. Pesquisas futuras são necessárias para compreender melhor a interação entre a microbiota e o hospedeiro para melhor desenvolver opções terapêuticas eficazes.

Referências bibliográficas

Allenspach, K., Culverwell, C., & Chan, D. (2016). Long-term outcome in dogs with chronic enteropathies : 203 cases. *The Veterinary Record*, *178*(15), 368. https://doi.org/10.1136/vr.103557

AlShawaqfeh, M., Wajid, B., Minamoto, Y., Markel, M., Lidbury, J., Steiner, J., Serpedin, E. and Suchodolski, J.S. 2017. A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93(11), 1–8.

Atherly, T., Rossi, G., White, R., Seo, Y.-J., Wang, C., Ackermann, M., Breuer, M., Allenspach, K., Mochel, J. P., & Jergens, A. E. (2019). Glucocorticoid and dietary effects on mucosal microbiota in canine inflammatory bowel disease. *PloS One*, *14*(12), e0226780. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226780

Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome : A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *32*(1), 9-25. https://doi.org/10.1111/jvim.14875

Berghoff, N., & Steiner, J. M. (2011). Laboratory tests for the diagnosis and management of chronic canine and feline enteropathies. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, *41*(2), 311-328. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.01.001

Berg, G., Rybakova, D., Fisher, D., Cernava, T., Vergès, M.-C., Charles, T., Chen, X, Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L.,Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. Microbiome, 8(1), 103. https://doi.org/10.1189/s40168-020-00875-0

Berlanda, M., Innocente, G., Simionati, B., Di Camillo, B., Facchin, S., Giron, M. C., Savarino, E., Sebastiani, F., Fiorio, F., & Patuzzi, I. (2021). Faecal Microbiome Transplantation as a Solution to Chronic Enteropathies in Dogs : A Case Study of Beneficial Microbial Evolution. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, *11*(5), 1433. https://doi.org/10.3390/ani11051433

Blake, A., Suchodolski, J, S., (2016). Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats. *Animal Frontiers*. 6(3), 37-42.

Borody, T. J., & Khoruts, A. (2011). Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *9*(2), 88-96. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.244

Borody, T. J., Paramsothy, S., & Agrawal, G. (2013). Fecal microbiota transplantation : Indications, methods, evidence, and future directions. *Current Gastroenterology Reports*, *15*(8), 337. https://doi.org/10.1007/s11894-013-0337-1

Boyle, R. J., Robins-Browne, R. M., & Tang, M. L. K. (2006). Probiotic use in clinical practice : What are the risks? *The American Journal of Clinical Nutrition*, *83*(6), 1256-1264; quiz 1446-1447. https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1256

Brandt, L. J. (2013). American Journal of Gastroenterology Lecture : Intestinal microbiota and the role of fecal microbiota transplant (FMT) in treatment of C. difficile infection. *The American Journal of Gastroenterology*, *108*(2), 177-185. https://doi.org/10.1038/ajg.2012.450

Breton, J. (2020) Microbiote intestinal, métabolisme énergétique et obésité, *Microbiome Foundation.* 10 Novembre 2020. Disponivel em: https://microbiome-foundation.org/microbiote-intestinal-metabolisme-energetique-et-obesite-partie-2/#:~:text=Le%20microbiote%20intestinal%20de%20patients,sujets%20non%20ob%C3%A8ses%201%2C2.

Burton, E. N., O'Connor, E., Ericsson, A. C., & Franklin, C. L. (2016). Evaluation of Fecal Microbiota Transfer as Treatment for Postweaning Diarrhea in Research-Colony Puppies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, *55*(5), 582-587.

Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome : At the interface of health and disease. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(4), 260-270. https://doi.org/10.1038/nrg3182

Collins, M.T. (2013) Canine Inflammatory Bowel Disease: Current and Prospective Biomarkers for Diagnosis and Management. *Vetleam*. 38(3),1-7

Dailey, F. E., Turse, E. P., Daglilar, E., & Tahan, V. (2019). The dirty aspects of fecal microbiota transplantation : A review of its adverse effects and complications. *Current Opinion in Pharmacology*, *49*, 29-33. https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.04.008

Deng, P., & Swanson, K. S. (2015). Gut microbiota of humans, dogs and cats : Current knowledge and future opportunities and challenges. *The British Journal of Nutrition*, *113 Suppl*, S6-17. https://doi.org/10.1017/S0007114514002943

Deusch, O., O'Flynn, C., Colyer, A., Swanson, K. S., Allaway, D., & Morris, P. (2015). A Longitudinal Study of the Feline Faecal Microbiome Identifies Changes into Early Adulthood Irrespective of Sexual Development. *PloS One*, *10*(12), e0144881. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144881

Dias, I. E., Pinto, P. O., Barros, L. C., Viegas, C. A., Dias, I. R., & Carvalho, P. P. (2019). Mesenchymal stem cells therapy in companion animals : Useful for immune-mediated diseases? *BMC Veterinary Research*, *15*(1), 358. https://doi.org/10.1186/s12917-019-2087-2

Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(26), 11971-11975. https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107

Doron, S., & Snydman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 60 Suppl 2, S129-134. https://doi.org/10.1093/cid/civ085

Eissa, N., Kittana, H., Gomes-Neto, J. C., & Hussein, H. (2019). Mucosal immunity and gut microbiota in dogs with chronic enteropathy. *Research in Veterinary Science*, *122*, 156-164. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.11.019

Ettinger S. J., Feldman E. C., Coté E., (2016) Textbook of Veterinary Internal Medicine - Diseases of the Dog and the Cat, Expert Consult. *Saunders*

Faucher Mathieu, Anais Combes, Yannick Bongrand (2016) Maladie inflammatoire chronique de l'intestin et lymphome de bas grade. *L'essentiel N°406 du 21 au 27 avril 2016.*

Garcia-Mazcorro, J. F., Lanerie, D. J., Dowd, S. E., Paddock, C. G., Grützner, N., Steiner, J. M., Ivanek, R., & Suchodolski, J. S. (2011). Effect of a multi-species synbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, *78*(3), 542-554. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01185.x

Guard, B. C., Barr, J. W., Reddivari, L., Klemashevich, C., Jayaraman, A., Steiner, J. M., Vanamala, J., & Suchodolski, J. S. (2015). Characterization of microbial dysbiosis and metabolomic changes in dogs with acute diarrhea. *PloS One*, *10*(5), e0127259. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127259

Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., & Salminen, S. (2015). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, *34*, 14-23. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002

Guilford, W. G., Jones, B. R., Markwell, P. J., Arthur, D. G., Collett, M. G., & Harte, J. G. (2001). Food sensitivity in cats with chronic idiopathic gastrointestinal problems. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *15*(1), 7-13. https://doi.org/10.1892/0891-6640(2001)015<0007:fsicwc>2.3.co;2

Hand, D., Wallis, C., Colyer, A., & Penn, C. W. (2013). Pyrosequencing the canine faecal microbiota : Breadth and depth of biodiversity. *PloS One*, *8*(1), e53115. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053115

Handl, S., Dowd, S. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2011). Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiology Ecology*, *76*(2), 301-310. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x

Heilmann, R. M., Berghoff, N., Mansell, J., Grützner, N., Parnell, N. K., Gurtner, C., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2018). Association of fecal calprotectin concentrations with disease severity, response to treatment, and other biomarkers in dogs with chronic inflammatory enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *32*(2), 679-692. https://doi.org/10.1111/jvim.15065

Heilmann, R. M., & Steiner, J. M. (2018). Clinical utility of currently available biomarkers in inflammatory enteropathies of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *32*(5), 1495-1508. https://doi.org/10.1111/jvim.15247

Hemarajata, P., & Versalovic, J. (2013). Effects of probiotics on gut microbiota : Mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, *6*(1), 39-51. https://doi.org/10.1177/1756283X12459294

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *11*(8), 506-514. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66

Honneffer, J. B., Minamoto, Y., & Suchodolski, J. S. (2014). Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(44), 16489-16497. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16489

Hooda, S., Vester Boler, B. M., Kerr, K. R., Dowd, S. E., & Swanson, K. S. (2013). The gut microbiome of kittens is affected by dietary protein:carbohydrate ratio and associated with blood metabolite and hormone concentrations. *The British Journal of Nutrition*, *109*(9), 1637-1646. https://doi.org/10.1017/S0007114512003479

Jergens, A. E., Crandell, J., Morrison, J. A., Deitz, K., Pressel, M., Ackermann, M., Suchodolski, J. S., Steiner, J. M., & Evans, R. (2010). Comparison of oral prednisone and prednisone combined with metronidazole for induction therapy of canine inflammatory bowel disease : A randomized-controlled

trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *24*(2), 269-277. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0447.x

Jergens, A. E., Crandell, J. M., Evans, R., Ackermann, M., Miles, K. G., & Wang, C. (2010). A clinical index for disease activity in cats with chronic enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *24*(5), 1027-1033. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0549.x

Jergens, A. E., & Simpson, K. W. (2012). Inflammatory bowel disease in veterinary medicine. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, *4*(4), 1404-1419. https://doi.org/10.2741/470

Jergens, A. E. (2012). Feline idiopathic inflammatory bowel disease : What we know and what remains to be unraveled. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *14*(7), 445-458. https://doi.org/10.1177/1098612X12451548

Jia, J., Frantz, N., Khoo, C., Gibson, G. R., Rastall, R. A., & McCartney, A. L. (2010). Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhoea. *FEMS Microbiology Ecology*, *71*(2), 304-312. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00812.x

Kathrani, A., Werling, D., & Allenspach, K. (2011). Canine breeds at high risk of developing inflammatory bowel disease in the south-eastern UK. *The Veterinary Record*, *169*(24), 635. https://doi.org/10.1136/vr.d5380

Knopp, R. H., & Paramsothy, P. (2006). Oxidized LDL and abdominal obesity : A key to understanding the metabolic syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *83*(1), 1-2. https://doi.org/10.1093/ajcn/83.1.1

Lee, Y.-K., Puong, K.-Y., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology*, *52*(Pt 10), 925-930. https://doi.org/10.1099/jmm.0.05009-0

Luoto, R., Ruuskanen, O., Waris, M., Kalliomäki, M., Salminen, S., & Isolauri, E. (2014). Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants : A randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *133*(2), 405-413. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.08.020

Makielski, K., Cullen, J., O'Connor, A., & Jergens, A. E. (2019). Narrative review of therapies for chronic enteropathies in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *33*(1), 11-22. https://doi.org/10.1111/jvim.15345

Marsilio, S., Pilla, R., Sarawichitr, B., Chow, B., Hill, S. L., Ackermann, M. R., Estep, J. S., Lidbury, J. A., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2019). Characterization of the fecal microbiome in cats with inflammatory bowel disease or alimentary small cell lymphoma. *Scientific Reports*, *9*(1), 19208. https://doi.org/10.1038/s41598-019-55691-w

Minamoto, Y., Otoni, C. C., Steelman, S. M., Büyükleblebici, O., Steiner, J. M., Jergens, A. E., & Suchodolski, J. S. (2015). Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, *6*(1), 33-47. https://doi.org/10.1080/19490976.2014.997612

Moser, K., Mitze, S., Teske, E., von Bomhard, W., & Stockhaus, C. (2018). Correlation of clinical, diagnostic and histopathological parameters in dogs with chronic lymphocytic-plasmacytic enteropathy. *Tierarztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, *46*(1), 15-20. https://doi.org/10.15654/TPK-170445

Niina, A., Kibe, R., Suzuki, R., Yuchi, Y., Teshima, T., Matsumoto, H., Kataoka, Y., & Koyama, H. (2019). Improvement in Clinical Symptoms and Fecal Microbiome After Fecal Microbiota Transplantation in a Dog with Inflammatory Bowel Disease. *Veterinary Medicine (Auckland, N.Z.)*, *10*, 197-201. https://doi.org/10.2147/VMRR.S230862

Normand, S., Secher, T., & Chamaillard, M. (2013). [Dysbiosis, a new medical concept]. *Medecine Sciences: M/S*, *29*(6-7), 586-589. https://doi.org/10.1051/medsci/2013296011

Ogué-Bon, E., Khoo, C., McCartney, A. L., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2010). In vitro effects of synbiotic fermentation on the canine faecal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, *73*(3), 587-600. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00915.x

Omori, M., Maeda, S., Igarashi, H., Ohno, K., Sakai, K., Yonezawa, T., Horigome, A., Odamaki, T., & Matsuki, N. (2017). Fecal microbiome in dogs with inflammatory bowel disease and intestinal lymphoma. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *79*(11), 1840-1847. https://doi.org/10.1292/jvms.17-0045

Ouwehand, A. C., Forssten, S., Hibberd, A. A., Lyra, A., & Stahl, B. (2016). Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of Medicine*, *48*(4), 246-255. https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1161232

Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Arseneau, K. O., Pizarro, T. T., & Cominelli, F. (2010). Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(1), 454-459. https://doi.org/10.1073/pnas.0910307107

Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(12), 7577-7587. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1

Pereira, G. Q., Gomes, L. A., Santos, I. S., Alfieri, A. F., Weese, J. S., & Costa, M. C. (2018). Fecal microbiota transplantation in puppies with canine parvovirus infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *32*(2), 707-711. https://doi.org/10.1111/jvim.15072

Pilla, R., & Suchodolski, J. S. (2019). The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*, 498. https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00498

Redfern, A., Suchodolski, J., & Jergens, A. (2017). Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease. *The Veterinary Record*, *181*(14),

Reiwald D., C. Pillonel, A.M. Villars & J.L. Cadoré. (2013). Anxiété et entéropathies inflammatoires chroniques idiopathiques chez le chien. *Revue Méd. Vét., 2013, 164, 3, 145-149*. https://doi.org/10.1136/vr.103826

Ritchie, L. E., Burke, K. F., Garcia-Mazcorro, J. F., Steiner, J. M., & Suchodolski, J. S. (2010). Characterization of fecal microbiota in cats using universal 16S rRNA gene and group-specific primers for Lactobacillus and Bifidobacterium spp. *Veterinary Microbiology*, *144*(1-2), 140-146. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.045

Sacoor, C., Barros, L. M., & Montezinho, L. (2021). What are the potential biomarkers that should be considered in diagnosing and managing canine chronic inflammatory enteropathies? *Open Veterinary Journal*, *10*(4), 412-430. https://doi.org/10.4314/ovj.v10i4.9

Sarowska, J., Choroszy-Król, I., Regulska-Ilow, B., Frej-Mądrzak, M., & Jama-Kmiecik, A. (2013). The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*, *22*(5), 759-766.

Schmitz, S., & Suchodolski, J. (2016). Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics—What is the evidence? *Veterinary Medicine and Science*, *2*(2), 71-94. https://doi.org/10.1002/vms3.17

Simpson, K.W., & A.E. Jergens. 2011. Pitfalls and Progress in the Diagnosis and Management of Canine Inflammatory Bowel Disease. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 41(2):381–398. doi:10.1016/j.cvsm.2011.02.003

Sivaprakasam, S., Prasad, P. D., & Singh, N. (2016). Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacology & Therapeutics*, *164*, 144-151. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.007

Somu, Y., Muthusamy, V., Krishnakumr, S., Arulkumar, T., Jayalakshmi, K., Mani, S., Muthusamy, R., Mani. S. and Selvaraj, P. 2017. Technical review on inflammatory bowel disease in dogs and cats. I*nt. J.Environ. Sci. Technol.* 6(3), 1833–1842.

Suchodolski, J. S. (2016). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, *215*, 30-37. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.04.011

Suchodolski, J. S., Camacho, J., & Steiner, J. M. (2008). Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, *66*(3), 567-578. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x

Suchodolski, J. S., Markel, M. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Unterer, S., Heilmann, R. M., Dowd, S. E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E. M., Steiner, J. M., Cook, A. K., & Toresson, L. (2012). The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PloS One*, *7*(12), e51907. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051907

Sugita, K., Yanuma, N., Ohno, H., Takahashi, K., Kawano, K., Morita, H., & Ohmori, K. (2019). Oral faecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhoea in a dog : A case report. *BMC Veterinary Research*, *15*(1), 11. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1754-z

Surawicz, C. M., Brandt, L. J., Binion, D. G., Ananthakrishnan, A. N., Curry, S. R., Gilligan, P. H., McFarland, L. V., Mellow, M., & Zuckerbraun, B. S. (2013). Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections. *The American Journal of Gastroenterology*, *108*(4), 478-498; quiz 499. https://doi.org/10.1038/ajg.2013.4

Swanson, K. S., Dowd, S. E., Suchodolski, J. S., Middelbos, I. S., Vester, B. M., Barry, K. A., Nelson, K. E., Torralba, M., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Cann, I. K. O., White, B. A., & Fahey, G. C. (2011). Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *The ISME Journal*, *5*(4), 639-649. https://doi.org/10.1038/ismej.2010.162

Toresson, L., Steiner, J. M., Suchodolski, J. S., & Spillmann, T. (2016). Oral Cobalamin Supplementation in Dogs with Chronic Enteropathies and Hypocobalaminemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *30*(1), 101-107. https://doi.org/10.1111/jvim.13797

Tsai, Y.-L., Lin, T.-L., Chang, C.-J., Wu, T.-R., Lai, W.-F., Lu, C.-C., & Lai, H.-C. (2019). Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. *Journal of Biomedical Science*, *26*(1), 3. https://doi.org/10.1186/s12929-018-0493-6

Walker, W. A. (2008). Mechanisms of action of probiotics. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *46 Suppl 2*, S87-91; discussion S144-151. https://doi.org/10.1086/523335

Wang, J.-W., Kuo, C.-H., Kuo, F.-C., Wang, Y.-K., Hsu, W.-H., Yu, F.-J., Hu, H.-M., Hsu, P.-I., Wang, J.-Y., & Wu, D.-C. (2019). Fecal microbiota transplantation : Review and update. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zh*i, 118 Suppl 1, S23-S31. https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.08.011

Zeng, M. Y., Inohara, N., & Nuñez, G. (2017). Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunology*, *10*(1), 18-26. https://doi.org/10.1038/mi.2016.75